

# VEGF-D-GEENINSIIRRON VAIKUTUS ROTAN LIHASVAMMAN PARANEMISEEN

Laura Harmanen

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Ohjaaja: Professori Tero Järvinen

Marraskuu 2015

# TIIVISTELMÄ

---

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Professori Tero Järvisen tutkimusryhmä

HARMANEN LAURA: VEGF-D-GEENINSIIRRON VAIKUTUS ROTAN LIHASVAMMAN PARANEMISEEN

Kirjallinen työ, 20 s.  
Ohjaaja: Professori Tero Järvinen

Marraskuu 2015

Avainsanat: VEGF-D, lihasvamma, paraneminen, angiogeneesi

---

Yli puolet urheiluvammoista on lihasvammoja. Nykyisen hoitokäytännön mukaan niitä hoidetaan pääsääntöisesti konservatiivisesti. Lääkkeellistä hoitoa lihasvammoihin ei ole, kuten ei myöskään muihin tuki- ja liikuntaelimistön traumaattisiin vammoihin.

Vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) eli verisuonikasvutekijä-D on VEGF-geeniperheseen kuuluva proteiini, joka vaikuttaa sekä fysiologiseen että patologiseen angiogeneesiin ja lymfangiogeneesiin. Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu sekä adeno- että bakulovirusvälitteisen VEGF-D-geeninsiirron saavan aikaan lisääntyntä luurankolihasen angiogeneesiä hapenpuutteesta kärsivissä tilanteissa eläinkokeissa. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää vaikuttaako adenovirusvälitteinen VEGF-D-geeninsiirto rotalle tehdyn lihasvamman paranemiseen.

Tutkimuksessa rottien soleus-lihaksessa olevaan vammakohtaan injisoitiin joko VEGF-D-virusta tai kontrolliryhmälle LacZ-virusta. Geeninsiirto tapahtui adenoviruksen välityksellä. Tarkasteltaviksi aikapisteiksi valittiin 5. ja 7. päivä. Tutkimusaineistoon sisältyi 12 rottia, joten lihasnäytteitä saatiin 24. Lihaksista tehtiin histologiset näytteet, joista arvioitiin vaurio-alueen verisuonten määrää, tiheyttä ja kokonaispinta-alaa. Tuloksia vertailtiin terapeuttisen geeninsiirron saaneiden sekä kontrolliryhmän rottien välillä.

Histologisessa analyysissä ei löydetty eroa terapeuttisen geeninsiirron ja kontrolliryhmän rottien lihasten paranemisessa. Aiheesta tarvitaan jatkossa lisää tutkimuksia, jotta lihasvammojen lääkkeellinen hoito voisi tulevaisuudessa toteutua. VEGF-D on hyvin potentiaalinen vaihtoehto lääkkeellisen hoidon kehitykselle huolimatta nyt saavutetuista vaatimattomista tutkimustuloksista.

## Sisälllys

1 JOHDANTO .....	4
1.1 Lihasvammat ja niiden paraneminen .....	4
1.2 VEGF-geeniperhe.....	6
1.3 VEGF-D.....	7
1.4 Tutkimuksen tarkoitus.....	8
2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....	10
2.1 Tutkimusaineisto .....	10
2.2 Toimenpide ja näytteiden valmistus .....	11
3 TULOKSET .....	13
3.1 Verisuonten lukumäärä .....	13
3.2 Verisuonten tiheys .....	13
3.3 Verisuonten kokonaispinta-ala .....	14
4 POHDINTA .....	15
LÄHDELUETTELO .....	20

# 1 JOHDANTO

Lihavammot ovat yleisimpiä urheiluvammoja, mutta yleisyydestään huolimatta niiden hoitoa ei ole paljoa tutkittu. (1) Tämän hetkisen hoitokäytännön mukaan lihavammoja hoidetaan vaikeusasteesta riippuen lyhyellä levolla ja antagonistilihasten harjoittelulla, vammautuneen raajan tukemisella harjoituksen ajaksi, venyttelyllä tai vaikeimmissa tapauksissa operatiivisin keinoin. Välittömästi vamman jälkeen noudatetaan kolmen K:n periaatetta eli kylmä, koho ja kompressio. Ilman kirurgisia toimenpiteitä potilas voi aloittaa normaalin, kovemman liikunnan maksimissaan 3 - 6 viikon kuluessa vammasta. Hoidon pituuteen vaikuttaa lihasvoimaominaisuuksien ja lihaksen venyvyyden palautuminen normaaleiksi. (2)

## 1.1 Lihavammot ja niiden paraneminen

Lihavammot voidaan jaotella kliinisesti venähdyksiin tai ruhjevammoihin riippuen vamman syntymekanismista. Yleisin lihavammojen aiheuttaja on mekaaninen isku, joka kohdistuu suoraan lihaseen. Ruhjevammoissa lihas repeytyy usein suoraan vauriokohdasta. Venähdyksissä taas repeämä sijoittuu lähemmäksi ns. myotendinaalijunktiota (MTJ) eli lihas-jänneliitosta. Lihaksen ollessa jännittynyt, jäävät vammat yleensä pinnallisemmiksi. (1) Lihavamman aiheuttama verenpurkauma eli hematooma voi olla joko lihaksen sisällä (intramuskulaarinen) tai lihasten väleissä (intermuskulaarinen). Tämän hetkisen tiedon mukaan lihavammot luokitellaan I, II, III ja IV asteen vammoihin. I asteen lievissä vammoissa vain muutama lihassyvy on revennyt, lihaskalvo on ehjä ja lihasvoima sekä liikkeet ovat säilyneet. II asteen vammoissa kohtalainen määrä lihassyitä on katkennut, mutta lihaskalvo on ehjä. Lihaksen sisälle on tullut verenpurkaumaa ja lihasvoima on selvästi heikentynyt. III asteen vammoissa 25–50 % koko lihaksesta ja lihaskalvo ovat revenneet, verenpurkauma on lihasten väleissä ja lihasvoima on edelleen heikentynyt. IV asteen vammassa suurin osa tai koko lihas on poikki, lihaskalvo on revennyt eikä lihaksessa ole enää mitään toimintaa. (2)

Lihavamman paranemisprosessi voidaan jaotella patologistesti tulehdus-, korjaus- ja uudelleenmuokkaus-vaiheeseen. Tulehdusvaiheessa pitkin lihassoluja leviävä hapenpuute eli nekroosi pysäytetään lihaksen soluliman proteiinien muodostamien esteiden (contraction band)

avulla. Revenneiden verisuonten kautta vauriopaikalle pääsee verihiutaleita, jotka aktivoituvat ja vapauttavat kemotaktisia proteiineja eli kasvutekijöitä, sytokiinejä ja kemokiinejä. Nämä houkuttelevat paikalle tulehdussoluja verenkierrosta. Myös lihassolujen soluvälitilassa on varastoituneena inaktiivisessa muodossa kasvutekijöitä, jotka aktivoituvat vamman tapahduttua ja voimistavat tulehdusreaktiota. Ensimmäisinä päivinä runsaslukuisimpia ovat neutrofiilit, jotka korvataan monosyyteillä, jotka taas erilaistuvat kudoksissa makrofageiksi. Makrofagit poistavat nekroottista materiaalia proteolyysin ja fagosytoosin avulla. Verenvuoto revenneistä verisuonista aiheuttaa myös revenneiden lihassolujen päiden välille syntyvän hematooman. Ensimmäisenä vamman jälkeisenä päivänä tulehdussolut, mukaan lukien fagosytoosiin pystyvät makrofagit, alkavat poistamaan verihyytymää. Fibriini ja fibronektiini muodostavat aikaista granulaatiokudosta, joka toimii rakennuspalustana vauriopaikalle vaeltaville, aktivoituille fibroblasteille. Fibroblastit tuottavat proteiineja ja proteoglykaaneja sidekudoksen rungoksi ja myöhemmin sidekudosarven muodostamaa tyyppin I kollageenia. Löyhä sidekudos revenneiden lihassyiden välissä takaa vaurioituneelle lihakselle tarvittavan vetolujuuden paranemisen aikana. (1)

Kolmannen päivän jälkeen vammasta alkavat korjaus- ja uudelleenmuokkausvaiheet, jolloin vaurioituneiden lihassolujen päät kuroutuvat toisiaan kohden ja lihasvamma paranee. Nekrotisoituneiden lihassolujen tilalle syntyy uusia lihassoluja lihaskudoksen omien kantasolujen eli nk. sateliittisolujen avulla. Sateliittisolut ovat kantasoluja, jotka sijaitsevat omana populaationa jokaisen lihassolun tyvikalvon alla. Sateliittisolupopulaatioita on kahdenlaisia: osa soluista erilaistuu lihassoluiksi välittömästi vamman tapahduttua (ns. committed satellite cells) kun taas osa jakautuu ennen erilaistumista (ns. stem satellite cells). Tällä varmistetaan sateliittisolujen riittäminen myös mahdollisten tulevien lihasvaurioiden korjaamiseen. Sateliittisolut erilaistuvat ensin myoblasteiksi, jonka jälkeen ne kypsyvät tavallisiksi poikkijuovaisiksi luurankolihas soluiksi ja fuusioituvat toistensa kanssa muodostaen pitkiä myotuubeja. (1) Sateliittisolujen joukossa on myös muita kantasoluja (muscle-derived stem cells), jotka pystyvät erilaistumaan esimerkiksi neuraalisiksi ja endoteliallisiksi soluiksi (3). Lihaksissa on myös muita kantasoluja, mutta niiden toiminta on huomattavasti hitaampaa kuin sateliittisolujen. Vauriopaikalla olevat tulehdussolut aktivoivat sateliittisoluja kasvutekijöillään ja sateliittisolut vuorostaan voimistavat tulehdusreaktiota erittämällä erilaisia kasvutekijöitä ja aiheuttamalla tulehdussolujen ekstravasaatiota eli siirtymistä verisuonten ulkopuolelle. Sidekudosarven molemmin puolin lihassolut alkavat hiljalleen kuroa väliä pienemmäksi ja lopulta voivat yhdistyä, jos välimatka revenneiden päiden välillä on riittävän pieni.

Vielä on hieman epäselvää, jääkö kuroutuneiden päiden välille pieni sidekudosväliseinä vai ei. Regeneroituvat, sidekudosarpeen tunkeutuvat lihassolut kiinnittyvät lateraalireunoiltaan myös soluväliaineeseen. Tämä antaa lisää vetolujuutta lihakselle, kun solut eivät ole vielä liittyneet toisiinsa. (1)

Korjausvaiheessa ehkä tärkein lihasvamman paranemisen edellytyksistä on uusien verisuonten muodostuminen eli kudoksen revaskularisaatio angiogeneesin kautta. Uusien verisuonten muodostus on merkki siitä, että lihaksen paraneminen on lähtenyt käyntiin. Uusia kapillaareja kasvaa vanhoista ja ehjistä verisuonista kohti vaurioitunutta aluetta. Tätä tapahtumaa kutsutaan angiogeneesiksi. Angiogeneesiä tarvitaan, jotta vauriopaikalle saadaan tarvittava määrä happea ja rakennusaineita muiden solujen energiatuotantoon. Nuorissa lihassoluissa on vain muutamia mitokondrioita, joten niiden kapasiteetti tuottaa energiaa anaerobisesti on hyvin matala. Ilman aerobista energiantuottoa lihassolut eivät pysty kypsymään normaalisti. Tämän vuoksi runsas revaskularisaatio on erittäin tärkeää lihasvamman paranemiselle. (1) Angiogeneesiä tehostavat monet tekijät, kuten verisuonikasvutekijä eli VEGF (vascular endothelial growth factor), transformoiva kasvutekijä TGF (transforming growth factor), angiopoietiinit, verihiutalekasvutekijä PDGF (platelet-derived growth factor), tuumorinekroositekijä TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), sidekudoskasvutekijä FGF (fibroblast growth factor) ja muut tulehdukseen liittyvät molekyylit. Tunnetuimpia yllä mainituista angiogeneettisistä kasvutekijöistä ovat VEGF-geeniperheen jäsenet. Geeniperheeseen kuuluu kokonaisuudessaan ainakin 7 eri geeniä, joista tärkeimmät ovat: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ja PGF (placental growth factor). (4)

## 1.2 VEGF-geeniperhe

VEGF:sta puhuttaessa tarkoitetaan usein angiogeneesille tärkeintä muotoa VEGF-A:ta. (4) Fysiologisesti VEGF-proteiinit sijaitsevat pääasiallisesti myosyyttien sisällä, mutta niitä on löydetty myös endoteelisolujen sekä perisyyttien sisältä. Myös solunulkoisen aineen proteoglykaaneilla on todettu olevan jonkinlainen osuus VEGF-molekyylien varastoinnissa. VEGF-molekyylit säilytetään myosyyttien solukalvon alla pienissä vesikkeleissä. On vielä epäselvää säilytetäänkö VEGF-molekyyliä vesikkeleissä myös endoteelisoluissa ja perisyyteissä. Kuitenkin VEGF-proteiinien paikallista kerääntymistä on osoitettu perisyyteistä. Lihassupistuksen aikana mekaaninen rasitus ja lihassupistus aiheuttavat lihaskudokseen hypoksiaa, joka lisää HIF-1 $\alpha$ :n (hypoxia-inducible factor

1 $\alpha$ ) ilmentymistä. HIF-1 $\alpha$  taas on tärkein transkriptiotekijä VEGF:lle. (5) Hypoksia aikaansaa HIF-1 $\alpha$ :n sitoutumisen VEGF:n promoottorin erääseen osaan, HRE:iin (hypoxia-response element), lisäten VEGF:n transkriptiota. (6) Lihassupistuksessa solujen ulkopuolelle kerääntyy ATP:n (adenosiinitrifosfaatti) aineenvaihdunnan seurauksena adenosiinia, joka lisää VEGF:n eritystä ja ilmentymistä. Rasituksen aikana endoteelisoluista vapautuu prostasykliiniä, joka myös lisää VEGF:n ilmentymistä. (5) Myös muut tekijät, kuten TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , FGF, PDGF, EGF (epidermal growth factor) ja IGF-1 (insulin-like growth factor-1) säätelevät VEGF:n ilmentymistä ja eritystä. (4)

VEGF-proteiinien vaikutukset välittyvät solukalvolla olevien VEGFR-reseptorien kautta. (4,7) Reseptoreja on kolmea eri tyyppiä, joista VEGFR-1 ja -2 esiintyvät spesifisesti endoteelisoluissa ja VEGFR-3 lähinnä vain imuteiden soluissa. Reseptorit ovat transmembraanisia tyrosiinikinaasireseptoreja, joiden rakenteeseen kuuluu 7 immunoglobuliininkaltaista solunulkoista, ligandia sitovaa osaa sekä solukalvon läpäisevä osa. Solukalvon sisäisessä osassa on kaksi tyrosiinikinaasidomeenia, TK-1 ja TK-2 (tyrosiinikinaasi-1 ja -2). Näitä osia erottaa kinaasien välinen välikappale. Reseptorien stimulaatio saa aikaan reseptorin dimerisaation ja tyrosiinosien fosforylaation. (7) VEGFR-2:n oletetaan olevan suuremmassa roolissa angiogeneesissä kuin VEGFR-1:n (5), mutta hypoksian on todettu lisäävän VEGFR-1:n ilmentymistä endoteelisoluissa (4). VEGF-A:n sitoutuminen VEGFR-1:een saa aikaan muutoksia verisuonten läpäisevyydessä eli permeabiliteetissä ja samalla VEGFR-1 toimii VEGF-A:n ilmentymisen negatiivisena säätelijänä. VEGFR-2:n aktivaatio saa aikaan muun muassa endoteelisoluissa jakaantumista, proliferaatiota ja suojaaa endoteelisoluja ohjelmoidulta solukuolemalta eli apoptoosilta (5,7). Biologinen vaste, jonka VEGFR-2:n aktivaatio saa aikaan vaihtelee hieman ligandista riippuen. Esimerkiksi VEGF-E:n sitoutuessa VEGFR-2:een endoteelisolut proliferoituvat, tulehdussolujen houkuttelu eli kemotaksis lisääntyy ja tubulaaristen rakenteiden muodostus kasvaa. Vain VEGF-C ja -D-molekyylit sitoutuvat VEGFR-3-reseptoriin aktivoiden imusuonten lymfangiogeneesiä. (7)

### 1.3 VEGF-D

VEGF-D syntetisoidaan ja eritetään suurena esiastemuotona, josta proteolyttisesti muokataan keskeisin, kypsä, biologisesti aktiivisin muoto. Esiaste-VEGF-D ensisijaisesti aktivoi VEGFR-3-reseptoreja, mutta kypsä muoto stimuloi myös aktiivisemmin endoteelisolujen VEGFR-2-reseptoreja. (8) VEGFR-3-reseptorin kautta VEGF-D vaikuttaa imuteiden endoteelisoluihin, kun taas

VEGFR-2-reseptorin kautta vaikutus kohdistuu verisuonten endoteelisoluihin. VEGF-D sitoutuu heikommin ja hitaammin VEGFR-2:een kuin VEGF-A, mutta vaikutuksen on todettu kestävän pidempään kuin VEGF-A:lla. (7) Aiemmissa tutkimuksissa on saatu tuloksia, joissa adenovirusvälitteinen VEGF-D-geeninsiirto lisää luurankolihasen angiogeneesiä sekä hiirillä että kaneilla. (8,9) Myös bakulovirusvälitteisellä VEGF-D-geeninsiirrolla kaneille on todettu VEGF-D:n ekspression ja vauriopaikan kapillaarien kasvun lisääntyvän. (10)

## 1.4 Tutkimuksen tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli luoda pohjaa tulevaisuuden lihasvammojen lääkkeelliselle hoidolle. Tutkimuksessa tarkasteltiin VEGF-D-geeninsiirron vaikutusta kokeellisen lihasvammamallin avulla. Tavoitteena oli löytää mahdolliset erot rotille tehtyjen lihasvammojen paranemisessa VEGF-D- tai ns. merkkigeenin eli LacZ-geeninsiirron saaneiden eläinten välillä. Tuloksissa pyrittiin etsimään eroja lihasvamman paranemisen nopeudessa ja verisuonten uudismuodostuksen eli angiogeneesin määrässä. Paranemisprosessia arvioitiin 5 tai 7 vuorokautta vamman jälkeen histologisista kudoksenäytteistä. Lihasnäytteet värjättiin immunohistokemiallisin menetelmin ja näytteitä analysoitiin kvantitatiivisesti virtuaalimikroskoopin avulla. Näytteistä määritettiin erilaisia paranemisparametrejä, joiden avulla voitiin arvioida ja verrata paranemisprosessia eri aikapisteiden näytteissä.

Lihavammojen tämän hetkinen hoitokäytäntö on suurimmaksi osaksi lääkkeetöntä (poissulkien kipulääkityksen). Operatiivisia keinoja tarvitaan harvoin, sillä konservatiivisella hoidolla saadaan aikaan hyviä lopputuloksia suurimmassa osassa tapauksia. Lievemmissä vammoissa (I asteen) voidaan lihaksen aktiivinen käyttö eli mobilisaatio aloittaa jo yhden vuorokauden kuluttua vammasta. Mitä vakavampi vamma on, sitä kauemmin lepoa jatketaan. Kuitenkin varhainen mobilisointi on vamman paranemisen kannalta ensiarvoisen tärkeää. Vakavissa vammoissa (III asteen) normaaliin urheiluun palaaminen voi kestää jopa kuukausia. Tästä huolimatta lihaksen varhainen aktiivinen käyttö matalalla rasitustasolla on suotavaa. Kilpaurheilijoille lihasvammat tuovat pitkiä kuntoutustaukoja ja tehokkaita harjoittelu- ja kilpailupäiviä menee hukkaan. Tavallisin ja samalla merkittävin komplikaatio lihasvammojen hoidossa on vamman uusiutuminen eli lihaksen uudelleen repeäminen samasta kohtaa. Tähän voi johtaa liian varhainen tai raju mobilisaatio, mutta myös pitkittynyt lepo ja siihen liittyvä lihaksen surkastuminen eli atrofia, joka altistaa lihaksen



repeämä-vaaraan. Kroonistuneita komplikaatioita voivat olla lihaksensisäisen arpikudoksen ja kiinnikkeiden muodostuminen, jolloin lihaksen elastisuus ja supistumiskyky heikkenevät. (2) Lääkkeellisellä hoidolla voitaisiin lihasvammojen paranemista tulevaisuudessa nopeuttaa ja komplikaatioita vähentää. Kun vamman paraneminen nopeutuu, pääsee potilas myös nopeammin takaisin normaalin urheilun pariin.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Tutkimusaineisto

Tutkimusaineisto koostui 12 täysikasvuisen, uros Sprague-Dawley rotan (Harlan) soleus-lihaksista saaduista histologisista kudospäätteistä. Rottien molempien säären soleus-lihaksiin tehtiin lihasvamma (Kääriäinen et al. 2001), minkä vuoksi kudospäätteitä saatiin yhteensä 24 kappaletta. Rotille tehtiin adenovirus-välitteinen geeninsiirto joko tutkittavalla VEGF-D-geenillä tai kontrolliryhmälle LacZ-merkkigeenillä (LacZ:  $\beta$ -galaktosidaasi), kuten aiemmin on kuvattu (8,11). Adenovirusten tuotanto ja toimivuus on kuvailtu aiemmin (Rissanen et al. 2003). Jokaista VEGF-D-geeninsiirtoa kohti tehtiin myös LacZ-geeninsiirto, jotta tutkimus- sekä kontrolliryhmät ovat yhtä suuret. Yhtään eläintä ei jouduttu rajaamaan tutkimuksen ulkopuolelle tai lopettamaan ennen tutkimusajan loppumista.

Rotat jaettiin kahteen ryhmään eri aikaryhmään, jotta lihasvammojen paranemisen histologiseen arviointiin saataisiin lisää näkökulmia. Aikapisteiksi valittiin 5. ja 7. päivä haavoituksesta, aikaisempien tutkimusten tulosten perusteella oletettiin angiogeneesin olevan suurimmillaan 4-7 vuorokauden jälkeen geeninsiirrosta (8,11). Taulukossa 1 on eriteltynä geeninsiirroittain montako rottaa sekä näytettä kuului aikaryhmiin.

Aikapiste	VEGF-D		LacZ	
5 vrk	Rotat	Näytteet	Rotat	Näytteet
	2	4	2	4
7vrk	Rotat	Näytteet	Rotat	Näytteet
	4	8	4	8

Taulukko 1. Rottien jaottelu ryhmiin aikapisteittäin sekä geeninsiirroittain ja näytteiden määrä

## 2.2 Toimenpide ja näytteiden valmistus

Lihavamman toteutettiin rotan soleus-lihakseen, kuten Kääriäinen ym. (2001) ovat aiemmin kuvanneet. Lihavamman suorittamisen ajaksi eläimet nukutettiin inhaloitavalla sevofluraanilla (Baxter, Deerfield, IL, USA). Toimenpiteessä eläimen takajalan säären iho ajettiin paljaaksi karvoista ja desinfioitiin 70 % alkoholiliuoksella. Tämän jälkeen ihoon tehtiin noin 1,5-2 cm:n pituinen viilto pohkeen lateraalipuolelle ja ihon alta paljastettiin takimmaisen lihasaition osalta sekä lihaskalvot että lihakset. Soleus-lihas paljastettiin varovasti ja tylpästi muiden lihasten alta ja katkaistiin pituussuunnassa puolesta välistä poikki mikrokirurgisilla saksilla. Tämän jälkeen katkaistun lihaksen molempiin päihin ruiskutettiin yhteensä 50 µl:ta adenovirusliuosta, joka sisälsi joko VEGF-D-genomin ( $5 \times 10^8$  PFU) tai LacZ-genomin ( $5 \times 10^8$  PFU). Geeninsiirron jälkeen lihaksen päät aseteltiin takaisin alkuperäisille paikoilleen kohden toisiaan ja ihohaava suljettiin ompeleilla. Sama toistettiin myös toiseen jalkaan. Toimenpiteen jälkeen rotille annettiin Vetergesic-kipulääkettä (1 µl/100 g).

Koe-eläimet lopetettiin suunniteltuina päivinä hiilidioksidi-narkoosilla ja soleus-lihakset kerättiin kudoksenäytteiksi. Lihakset kiinnitettiin pienelle korkkialustalle upottamalla ne kudosten käsittelyyn tarkoitetulla geelimäisellä nesteellä (Tissue-tek) niin, että akillesjänne kiinnitettiin samaan pätyyn kuin merkkitekstit ja etupuoli aseteltiin ylöspäin. Lihasnäytteet jäädytettiin kiinnityksen jälkeen välittömästi nestetypessä.

Jäädytetyistä lihasnäytteistä leikattiin histologiset näytteet, joista värjättiin immunohistokemiallisilla värjäyksillä verisuonet käyttämällä hyväksi vasta-ainetta, joka tunnistaa endoteelisolujen spesifisen proteiinin CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule) (rotan vasta-aine hiiren CD31 vastaan, BD Pharminogen, Oxford, UK). Primaarivasta-aine tunnistettiin horseradish peroksidaasi-konjugoidulla sekundaarivasta-aineella (rotan tunnistava Histofine, Nichirei Bio, Tokyo, Japan). Primaarivasta-aineen epäspesifisen sitoutumisen välttämiseksi kudokset ns. blokattiin ennen immunohistokemiallista värjäystä XMF963 XM-Factor-reagenssilla valmistajan ohjeiden mukaisesti (Biocare, Concord, CA, USA). Lisäksi regeneroituvat lihassäikeet tunnistettiin haavasta desmiinin tunnistavalla vasta-aineella. Värjäyksen jälkeen näytteet kuvattiin digitaaliseen muotoon ScanScope XT<sup>®</sup> näytelasiskannerilla. Digitaalisista kuvista haavan morfometriset määritykset tehtiin Image Scope Viewer<sup>®</sup> -ohjelmalla, kuten Järvinen & Ruoslahti (2010) ovat aikaisemmin kuvanneet. Näytteistä etsittiin vaurioalueelta terveen kudoksen ja

granulaatiokudoksen rajapinta, jonka jälkeen paraneva kudos rajattiin analyysiin. Kudosleikkeistä määritettiin analysoidulta alueelta verisuonten määrä, tiheys (kpl/ $\mu\text{m}^2$ ) sekä kokonaispinta-ala ( $\mu\text{m}^2$ ). Parametrit kerättiin Excel-taulukkoon ja tilastolliset vertailutestit suoritettiin SPSS-ohjelmalla.

### 3 TULOKSET

Histologisesti analysoitiin tulokset 24 lihasvammanäytteestä, joista yhteensä 16 näytettä oli 7 vuorokauden ja 8 näytettä 5 vuorokauden aikapisteestä. 5 vuorokauden näytteistä yhden skannaus virtuaalimikroskooppiin epäonnistui, joten sen tietoja ei voitu tuloksiin huomioida. Tilastollisesti vertailtiin paranemista mittaavien parametrien keskiarvoja kontrolliryhmän ja VEGF-D-geeninsiirtoryhmän välistä tilastollista eroa. Tilastollisessa analyysissä ero laskettiin t-testin avulla ja tilastollisesti merkittävän tuloksen raja-arvoksi valittiin  $p < 0.05$  95 %:n luottamusvälillä. DESMIN-värijäys epäonnistui, sillä se antoi jo silmämääräisesti arvioituna liikaa vääriä positiivisia tuloksia. Tämän vuoksi kyseinen värijäys ja sen analysointi jätettiin tämän tutkimuksen ulkopuolelle. VEGF-D-geeninsiirto- tai kontrolliryhmien välillä ei löydetty tilastollisesti merkittävää eroa paranemisessa yhdessäkään tutkitussa muuttujassa.

#### 3.1 Verisuonten lukumäärä

7 vuorokauden VEGF-D-näytteissä verisuonten kokonaislukumäärä oli 3167 verisuonta analysoitavalla alueella, kun taas kontrollinäytteissä verisuonten lukumäärän oli 6325 verisuonta ( $p=0.07$ , CI 95 %). 5 vuorokauden aikapisteessä verisuonten lukumäärän keskiarvo oli VEGF-D-näytteissä 2965 verisuonta analysoitavalla alueella ja kontrollinäytteissä 3306 verisuonta analysoitavalla alueella ( $p=0.42$ , CI 95 %).

#### 3.2 Verisuonten tiheys

7 vuorokauden aikapisteessä analysoitavan alueen verisuonten tiheyden keskiarvo oli VEGF-D-näytteissä  $2.08 \times 10^{-4}$  kpl/ $\mu\text{m}^2$  ja kontrolliryhmän näytteissä  $2.24 \times 10^{-4}$  kpl/ $\mu\text{m}^2$  ( $p=0.58$ , CI 95 %). 5 vuorokauden aikapisteessä VEGF-D-näytteiden verisuonten tiheyden keskiarvo oli  $1.8 \times 10^{-4}$  kpl/ $\mu\text{m}^2$  ja kontrolliryhmän näytteissä  $2.5 \times 10^{-4}$  kpl/ $\mu\text{m}^2$  ( $p=0.27$ , CI 95 %).

### 3.3 Verisuonten kokonaispinta-ala

7 vuorokauden aikapisteessä analysoitavan alueen verisuonten kokonaispinta-alojen keskiarvo oli VEGF-D-näytteissä  $1067204 \mu\text{m}^2$  ja kontrollinäytteissä  $2030802 \mu\text{m}^2$  ( $p=0.09$ , CI 95 %). 5 vuorokauden aikapisteessä VEGF-D-näytteiden verisuonten kokonaispinta-alojen keskiarvo oli  $903029,9 \mu\text{m}^2$  ja kontrolliryhmän näytteissä  $949754,5 \mu\text{m}^2$  ( $p=0.44$ , CI 95 %).

## 4 POHDINTA

Useita erilaisia solu- ja molekyylibiologiaan pohjaavia hoitomuotoja kuten kasvutekijöitä, geeniterapiaa ja kantasoluja, on esitetty kiihdyttämään vammojen jälkeistä kudosten regeneraatiota. Angiogeneesillä eli verisuonten uudismuodostuksella on keskeinen funktio kudosten paranemisessa. Mitä enemmän ja nopeammin vaurioalueelle syntyy verisuonia, sen parempi kudoksen toipuminen vammasta on. Täten angiogeneettisten kasvutekijöiden geeniterapeuttinen siirto kudosten vaurioon on mielenkiintoinen ja potentiaalisesti kliinisesti relevantti vaihtoehto parantaa vammautuneiden potilaiden toipumista vammoistaan. Angiogeneettisiä kasvutekijöitä on tutkittu erilaisissa kudosten vamma-malleissa verrattain vähän viimeisten vuosien aikana. Suurin osa julkaistusta tutkimustiedosta on suoritettu erilaisissa kokeellisissa hapenpuute-malleissa, joissa kudoksille ei aiheuteta suoranaista kudosten vammaa.

Rissanen ym. (2003) selvittivät tutkimuksessaan adenovirusvälitteisen VEGF-A, -B tai kokopitkän tai kypsän VEGF-C tai VEGF-D:n mahdollista vaikutusta angiogeneesiin kanin takaraajan hapenpuute-mallissa. Kontrollinäytteisiin tehtiin geeninsiirto Lac-Z-genomia sisältävällä adenoviruksella. Eläimeltä poistettiin pinnallinen reisivaltimo ja sen tilalle kiinnitettiin polvinivelen seudulta kaksi pienempää valtimoa kollateraalisuonituksen muodostusta varten. Poistamalla isompi valtimo saatiin aikaan raajaan huomattava iskemia. 7 vuorokautta vammauttamisen jälkeen eläimille tehtiin geeninsiirto. 5 vuorokautta geeninsiirron jälkeen takaraajan verisuonten permeabiliteettiä ja turvotusta monitoroitiin ja 6 vuorokautta geeninsiirron jälkeen lihaksen perfuusio ja verisuonten permeabiliteetti määritettiin fluoresenssimikrosfäärillä (fluoresence microsphere). Ko. määritysten jälkeen näytteet kerättiin histologista analyysiä varten. Tuloksena tutkijat löysivät huomattavan verisuonten koon suurentumisen VEGF-A- ja VEGF-D-geeninsiirrolla. Kyseiset geenit saivat aikaan myös VEGFR-2-reseptorin ilmentymisen lisääntymisen sekä verisuonten permeabiliteetin kasvun. VEGF-A ja -D vaikuttivat endoteelisolujen lisäksi myös perisyytteihin ja sileän lihaksen soluihin.

Heikura ym. (2012) tarkastelivat tutkimuksessaan bakulovirusvälitteisen VEGF-D-geeninsiirron vaikutusta kanin semimembranosus-lihaksen kapillaarien kasvuun. Kontrolliryhmälle tehtiin tässäkin tutkimuksessa Lac-Z-geeninsiirto sekä adeno- että bakulovirusvälitteisesti. Ryhmä testasi myös toleranssia eri bakulovirusannoksille. VEGF-D-geeninsiirroissa virusliuosta injisoitiin kanin

semimebranosus-lihaksiin kymmenellä erillisellä kerralla, 50 µl:a kerrallaan. Lihaksen perfuusiota arvioitiin CPS-ultraäänikuvauksella (contrast pulse sequence ultrasound imaging). 6 vuorokautta geeninsiirrosta lihakset kerättiin histologisiksi näytteiksi ja analysoitiin. Verisuonten permeabiliteetissä ei löydetty tilastollisesti merkittäviä eroja VEGF-D- ja LacZ-geeninsiirron saaneiden eläinten välillä. Merkittävä ero löytyi kuitenkin kapillaarien koossa. Kapillaarien pinta-alan keskiarvo oli huomattavasti suurempi VEGF-D-geeninsiirron saaneilla kuin kontrolliryhmissä ( $p=0.003$ ). Bakulovirusannostuksien osalta huomattiin, että liian suuri annos virusta johti infektoitujen solujen kuolemaan. Bakulovirusvälitteisen VEGF-D-geeninsiirron ei kuitenkaan katsottu yltävän samalle tasolle kuin adenovirusvälitteisen geeninsiirron.

Anisimov ym. (2009) tutkivat VEGF-C ja -D-geenien rAAV-geeninsiirtotekniikalla (recombinant adeno-associated virus) tehtyjen geeninsiirtojen vaikutusta hiirillä. Tutkimuksen tarkoituksena oli tarkastella pitkäaikaista transgeenistä ilmentymistä, koska muissa tutkimuksissa on tarkasteltu vain lyhytaikaisen ilmentymisen vaikutuksia. Hiiren tibialis anterior-lihakseen tehtiin joko ihmisen tai hiiren VEGF-C- tai -D-geeninsiirto. Näytteitä tarkasteltiin 2 ja 4 viikon aikapisteissä ja huomattiin, että VEGF-C ja -D molemmat saavat aikaan sekä angiogeneesiä että lymfangiogeneesiä, joista jälkimmäinen tuntui olevan biologisesti merkittävämpi ilmiö 4 viikon kohdalla.

Kholova ym. (2009) tutkivat adenovirusvälitteisen VEGF-D- ja -A-geeninsiirron vaikutusta hyperkolesterolemiasta kärsivien hiirten takajalkojen verenkiertoon. Terapeuttinen geeninsiirto suoritettiin ihmisen VEGF-D ja A-geeneillä ja kontrolliryhmän lihaksiin injisoitiin sekä LacZ-geeniä että suolaliuosta. Hiiriä seurattiin 4, 7, 14, 28 ja 42 vuorokauden ajan. Tuloksia arvioitiin histologisin menetelmin, Doppler-ultraäänikuvauksilla sekä magneettikuvauksilla. Analysoitavia vastetapahtumia olivat verisuonten määrä, verisuonten kasvun muutokset, suonten angiogeeninen tai lymfangiogeeninen fenotyyppi, valtimo- tai laskimo-fenotyyppi, perisytyttien kattavuus verisuonten pinnalla, lihasten perfuusio sekä turvotus. Tutkimusryhmä sai tuloksia, joissa VEGF-D sai aikaan huomattavan uusien verisuonten muodostumisen. Angiogeneesi oli voimakkaimmillaan 4-7 päivän kohdalla geeninsiirrosta ja vaikutus kesti aina 28 päivään saakka. Lisäksi VEGF-D lisäsi perisytyttien määrää ja sillä todettiin olevan lievä lymfangiogeneettinen vaikutus, jonka arvioitiin vähentäneen turvotusta. Lihasten perfuusion katsottiin olevan voimakkaimmillaan ensimmäisen viikon aikana geeninsiirrosta.



Omassa tutkimuksessani analysoitiin adenovirusvälitteisen VEGF-D-geeninsiirron vaikutusta rotan soleus-lihakseen tehdyn lihasvamman paranemiseen. Kontrolliryhmälle tehtiin geeninsiirto adenovirusvälitteisesti LacZ-geenillä. Paranemisparametreiksi määriteltiin analysoitavalta alueelta verisuonten määrä, tiheys ja kokonaispinta-ala. Tarkasteltaviksi aikapisteiksi valittiin 5 ja 7 vuorokautta geeninsiirrosta. Tutkimuksessa ei löydetty tilastollisesti merkittävää eroa terapeuttisen geeninsiirron saaneiden ja kontrolliryhmän eläinten välillä.

Aiemmissa tutkimuksissa ei ole aiheutettu eläimille joko ollenkaan tai yhtä suurta lihasvammaa. VEGF-D-geeninsiirto on tehty joko terveeseen tai iskeemiseen lihakseen. (8-11) Omassa tutkimuksessani lihasvamma oli suuri ja aiheutti paljon kudostuhoa, koska lihas katkaistiin kokonaisuudessaan. Lisäksi on huomioitava, että geeninsiirto suoritettiin kudოსvauriokohtaan. Tämä oli ensimmäisiä tutkimuksia, jossa eläinmallin avulla testattiin geeninsiirron vaikutusta isompaan lihasvammaan. Virus-välitteinen geeniterapia on aina toksinen soluille. Näin on mahdollista, että geeninsiirtomme itse asiassa tappaa osan viruksella infektoiduista soluista, sillä nämä solut ovat jo valmiiksi hapenpuutteesta ja kudოსvauriosta kärsivällä alueella ja ovat täten todennäköisesti herkempiä virusten toksisille vaikutuksille. Tämä oli kuitenkin tutkimuksen ehdoton vahvuus. Vain valitsemallamme strategialla voi olla mahdollisuus hoitaa kudოსvaurioita vakavien tapaturmien jälkeen.

Tulevaisuutta ajatellen lääkkeellinen hoito lihasvammoihin kohdistuu juuri lihasten repeämiin. Urheiluvammoista yli puolet on lihasvammoja (2), jonka vuoksi lääkkeelliselle hoidolle olisi tarvetta. Jotta hoidosta olisi hyötyä, tulisi geeninsiirron indusoida angiogeneesiä mahdollisimman nopeasti. Tällöin repeytyneen lihaksen päät lähtisivät kasvamaan takaisin yhteen nopeammin ja hoitoaika lyhenisi. Lihaksen mobilisaatio eli aktiivinen käyttö voitaisiin myös aloittaa aikaisemmin, joka itsessään auttaa vamman paranemisessa ja pienentäisi käyttämättömyyden aiheuttamaa atrofiaa lihassäikeissä. Terapeuttista geeninsiirtoa voitaisiin myös käyttää kirurgisten operaatioiden jälkihoitona, jotta paraneminen ja kuntoutuminen olisivat nopeampia.

Aiemmissa tutkimuksissa angiogeneesin on todettu olevan voimakkaimmillaan 4-7 päivän kuluttua geeninsiirrosta (8,11). Tässä tutkimuksessa lihasvamma oli kuitenkin niin massiivinen, että tilastollisesti merkittäviä tuloksia ei saatu aikaan tässä ajassa. Kontrolliryhmässä oli jopa enemmän verisuonia kuin terapeuttisen geeninsiirron saaneilla. Tähän saattoi vaikuttaa toimenpiteen

suorituksessa syntyneet tekniset vaikeudet. Rottien soleus-lihas on niin pieni ja katkaistuna sen päihin on hankalaa injisoida 50 µl:a nestettä. Virusliuoksesta lähes poikkeuksetta osa, pienempi tai suurempi, valui ulos katkenneesta lihaksesta. Kuitenkaan minkäänlaista yhdenmukaisuutta ei havaittu paranemisessa vaikka osa virusliuoksesta ei olisi saatu lihakseen. Lihaksia kerätessä osa lihaksista ei ollut kasvanut juuri lainkaan yhteen, kun taas osa oli lähes kokonaan kiinni toisissaan. Tämä viittaa siihen, että kirurgisessa toimenpiteessä oli vielä paljon puutteita toistettavuudessa. Yhdenmukaisuutta ei tässäkään ollut huomattavissa terapeutin geeninsiirron saaneilla tai kontrolliryhmällä. Molemmissa ryhmissä oli sekä huonosti että hyvin parantuneita lihaksia. Lihavamman suuruus voi omalta osaltaan vaikuttaa geeninsiirron onnistumiseen.

Histologisessa analyysissä tuotti vaikeuksia toisen värjäyksen epäonnistuminen. DESMIN-värjäyksellä olisi saatu lisää informaatiota VEGF-D-geeninsiirron onnistumisesta, koska desmiini on regeneroivissa myoblasteissa ja myotuubeissa ilmentyvä proteiini. Valitettavasti tulokset eivät olleet luotettavia. Silmämääräisesti pystyi arvioimaan, että värjäys antoi liikaa vääriä positiivisia tuloksia. Kuitenkin CD31-värjäys toimi luotettavasti ja analyysit pystyttiin suorittamaan. Jälkimmäinen menetelmä toimi moitteettomasti ja sen avulla saatiin selville tarvittavat arvot paranemisparametreihin. CD31-värjäystä on luotettava ja yleisesti tieteellisessä kirjallisuudessa käytetty menetelmä määrittämään verisuonten määrää.

Rottien hyvinvoinnin ja eettisen käsittelyn kannalta tutkimus onnistui hyvin. Rotat nukutettiin toimenpiteen ajaksi ja kipulääkittiin toimenpiteen yhteydessä sekä seuraavana päivänä ja tarvittaessa myös muina päivinä. Rotat käyttäytyivät, liikkuvat ja söivät normaalisti tutkimuksen ajan. Ompeleet eivät haitanneet rottia, eivätkä rajoittaneet niiden toimintaa. Eläimet eivät myöskään vaikuttaneet kivuliailta. Ainoastaan yksi rotta kahdestatoista jyrssi ompeleet toistuvasti auki vasemmasta jalastaan ja tällä saattoi olla vaikutusta lihasvamman paranemiseen. Kyseinen yksilö sai kuitenkin jokaisen suturoinnin yhteydessä kipulääkettä.

Tulevaisuudessa tarvitaan lisää tutkimusta tästä aiheesta. Tutkimusmenetelmää ja -tekniikkaa voi vielä hioa ja lihasvammojen paranemista tulisi seurata pidempi aika, esimerkiksi 14 vuorokautta, koska paraneminen oli hyvin varhaisessa vaiheessa ja geeninsiirron aiheuttama geenin ilmentyminen jatkuu yli kahden viikon ajan. Virusliuoksen voisi injisoida lihakseen ennen lihaksen katkaisemista, jolloin suurempi osa päätyisi paikallisesti vaurioalueelle. Aineiston tulee olla myös suurempi, jotta

saataisiin tilastollisesti merkittäviä tuloksia. Nähtäväksi jää, hoidetaanko tulevaisuudessa lihasvammoja lääkkeellisesti. VEGF-D-geeninsiirrolla saattaa kuitenkin olla huomattava potentiaali lääkkeellisen hoidon kehittämisessä vakavien kudsvaurioiden hoitoon.

## LÄHDELUETTELO

- (1) Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 2005 May;33(5):745-764.
- (2) Kääriäinen M, Järvinen M. Lihasvammojen diagnostiikka ja hoitoperiaatteet. *Suomen Lääkärilehti* 2005;60(40):3971-3976.
- (3) Huard J, Cao B, Qu-Petersen Z. Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 2003;69(3):230-237.
- (4) Maria Vähätupa. Rras-geenin merkitys hiiren verkkokalvon angiogeneesille. Helsinki: Helsingin yliopisto, Biotieteiden laitos; 2013.
- (5) Hoier B, Hellsten Y. Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation* 2014 May;21(4):301-314.
- (6) Wagner PD. The critical role of VEGF in skeletal muscle angiogenesis and blood flow. *Biochem Soc Trans* 2011 Dec;39(6):1556-1559.
- (7) Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008 Jul;73(7):751-762.
- (8) Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, et al. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 2003 May 30;92(10):1098-1106.
- (9) Anisimov A, Alitalo A, Korpisalo P, Soronen J, Kaijalainen S, Leppanen VM, et al. Activated forms of VEGF-C and VEGF-D provide improved vascular function in skeletal muscle. *Circ Res* 2009 Jun 5;104(11):1302-1312.
- (10) Heikura T, Nieminen T, Roschier MM, Karvinen H, Kaikkonen MU, Mahonen AJ, et al. Baculovirus-mediated vascular endothelial growth factor-D(DELTANDELTA) gene transfer induces angiogenesis in rabbit skeletal muscle. *J Gene Med* 2012 Jan;14(1):35-43.
- (11) Kholova I, Koota S, Kaskenpää N, Leppanen P, Narvainen J, Kavec M, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of human vascular endothelial growth factor-d induces transient angiogenic effects in mouse hind limb muscle. *Hum Gene Ther* 2007 Mar;18(3):232-244.
- (12) Minna Kääriäinen. Adhesion and Biomechanics in Regenerating Skeletal Muscle. Tampere: University of Tampere, Medical School; 2001.
- (13) Jarvinen TA, Ruoslahti E. Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Dec 14;107(50):21671-21676.